

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

GEÄNDERTE FASSUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
13. Oktober 2005 (13.10.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2005/095446 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C07K 14/195**

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2005/001543

(22) Internationales Anmeldedatum:

16. Februar 2005 (16.02.2005)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2004 013 988.1 19. März 2004 (19.03.2004) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **HENKEL KOMMANDITGESELLSCHAFT AUF AKTIEN** [DE/DE]; Henkelstr. 67, 40589 Düsseldorf (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **FEESCHE, Jörg** [DE/DE]; Georg-Büchner Str. 23, 40699 Erkrath (DE). **MEINHARDT, Friedhelm** [DE/DE]; Erlengrund 207, 48308 Senden (DE). **NAHRSTEDT, Hannes** [DE/DE]; Martin-Niemöller-Str. 1, 48159 Münster (DE). **WALDECK, Jens** [DE/DE]; Im Wieshof 8, 58708

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) **Title:** FACTOR RECA FROM BACILLUS LICHENIFORMIS AND RECA-INACTIVATED SAFETY STEMS USED FOR BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION

(54) **Bezeichnung:** DER FAKTOR RECA AUS BACILLUS LICHENIFORMIS UND RECA-INAKTIVIERTE SICHERHEITSTÄMME FÜR DIE BIOTECHNOLOGISCHE PRODUKTION

A.1		10 J/m ²
A.2		
A.1		20 J/m ²
A.2		
A.1		30 J/m ²
A.2		
A.1		40 J/m ²
A.2		

(57) **Abstract:** The invention relates to the factor RecA from *Bacillus licheniformis* DSM 13 (SEQ ID NO. 2), along with the associated gene *recA* (SEQ ID NO. 1), including related proteins and genes thereof, such as the variant indicated under SEQ ID NO. 31 and 32, among others. According to the invention, gene *recA* is used for constructing gram-positive bacterial safety stems for biotechnological production, among other things, by inactivating the same in the respective stems. In a special embodiment, said stems are provided with additional functional deletions in phase-IV sporulation genes, preferably in gene *spoIV* (in *Bacillus licheniformis*), gene *yqfD* (in *B. subtilis*), or the respective gene that is homologous thereto if said stems are naturally able to form spores. Furthermore, the inventive RecA represents a protein which can be used in molecular biological assays or for modulating the molecular biological activities of cells, especially in connection with DNA polymerization or recombination processes.

(57) **Zusammenfassung:** Gegenstand der vorliegenden Anmeldung ist der Faktor RecA aus *Bacillus licheniformis* DSM 13 (SEQ ID NO. 2), zusammen mit dem zugehörigen Gen *recA* (SEQ ID NO. 1), einschließlich ver-

wandten Proteinen und Genen hierzu, darunter der unter SEQ ID NO. 31 beziehungsweise 32 angegebenen Variante. Das Gen *recA* wird erfindungsgemäß unter anderem zur Konstruktion von grampositiven bakteriellen Sicherheitsstämmen für die biotechnologische Produktion eingesetzt, indem es in den betreffenden Stämmen inaktiviert wird. Diese weisen, sofern sie natürlicherweise zur Sporulation befähigt sind, in einer speziellen Ausführungsform zusätzliche funktionelle Deletionen in Phase-IV-Sporulationsgenen auf, vorzugsweise im Gen *spoIV* (bei *Bacillus licheniformis*), im Gen *yqfD* (bei *B. subtilis*) beziehungsweise in dem hierzu jeweils homologen Gen. Des weiteren steht mit diesem RecA ein Protein zur

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2005/095446 A1



Menden (DE). **GROENE, Mark** [DE/DE]; Berlinger Str. 33, (App. 1110), 55101 Mainz (DE). **EICHSTÄDT, Renee** [DE/DE]; Auerstrasse 11, 50733 Köln (DE).

EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(81) **Bestimmungsstaaten** (*soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) **Bestimmungsstaaten** (*soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(88) **Veröffentlichungsdatum des geänderten internationalen Recherchenberichts:**

15. Dezember 2005

(15) **Informationen zur Berichtigung:**

siehe PCT Gazette Nr. 50/2005 vom 15. Dezember 2005, Section II

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2005/001543

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07K14/195

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, MEDLINE, WPI Data, PAJ, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category ^o	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/29113 A (NOVOZYMES BIOTECH, INC; NOVOZYMES A/S) 11 April 2002 (2002-04-11)	38,43
X	page 164, line 16	38
X	page 174, line 16	43
X	----- KUNST F ET AL: "THE COMPLETE GENOME SEQUENCE OF THE GRAM-POSITIVE BACTERIUM BACILLUS SUBTILIS" NATURE, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, GB, vol. 390, 1997, pages 249-256, XP000919353 ISSN: 0028-0836 the whole document -----	1-5,38, 43
	- / --	

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 September 2005

Date of mailing of the international search report

23.09.2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Stoyanov, B.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2005/001543

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	VEITH B ET AL.: "The complete genome sequence od <i>Bacillus Licheniformis</i> DSM13, an organism with great industrial potential" JOURNAL OF MOLECULAR MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 7, no. 4, 31 March 2004 (2004-03-31), pages 204-211, XP009047713 the whole document -----	1-7,31, 32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2005/001543

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see supplemental sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT**PCT/ISA/210**

International application No.

PCT/EP2005/001543

The International Searching Authority has determined that this international application contains multiple (groups of) inventions, as follows:

1. Claims: 1-37, 44-47 (completely), 38-42 (partially)
an recA-encoding nucleic acid and its use
2. Claims: 38-42, 17-24 (partially)
a nucleic acid adjacent *in vivo* to the recA-encoding nucleic acid and its use
3. Claim: 43 (completely)
a nucleic acid which encodes a spoIV subsequence, or a nucleic acid adjacent *in vivo* to the nucleic acid which encodes the spoIV subsequence

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2005/001543

Patent document cited in search report	Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 0229113	A 11-04-2002	AU EP US	9671801 A 1355931 A2 2002146721 A1		15-04-2002 29-10-2003 10-10-2002

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2005/001543

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C07K14/195

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, MEDLINE, WPI Data, PAJ, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^a	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr. ^b
X	WO 02/29113 A (NOVOZYMES BIOTECH, INC; NOVOZYMES A/S) 11. April 2002 (2002-04-11)	38,43
X	Seite 164, Zeile 16	38
X	Seite 174, Zeile 16	43
X	----- KUNST F ET AL: "THE COMPLETE GENOME SEQUENCE OF THE GRAM-POSITIVE BACTERIUM BACILLUS SUBTILIS" NATURE, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, GB, Bd. 390, 1997, Seiten 249-256, XP000919353 ISSN: 0028-0836 das ganze Dokument -----	1-5,38, 43
		-/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

<p>^a Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmelde datum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmelde datum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p>	<p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmelde datum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist</p> <p>"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>
---	---

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

16. September 2005

23.09.2005

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Stoyanov, B

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2005/001543

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	<p>VEITH B ET AL.: "The complete genome sequence od <i>Bacillus Licheniformis</i> DSM13, an organism with great industrial potential" JOURNAL OF MOLECULAR MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, Bd. 7, Nr. 4, 31. März 2004 (2004-03-31), Seiten 204-211, XP009047713 das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-7,31, 32

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2005/001543

Feld II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

2. Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich

3. Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
 Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/ EP2005/ 001543

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-37, 44-47 (vollständig), 38-42 (teilweise)

Eine recA codierende Nukleinsäure und ihre Verwendung

2. Ansprüche: 38-42, 17-24 (teilweise)

Eine an der recA codierende Nukleinsäure in vivo benachbarte Nukleinsäure und ihre Verwendung

3. Anspruch: 43 (vollständig)

Eine für eine Teilsequenz von spoIV codierende, oder für eine mit spoIV in vivo benachbarte Teilsequenz

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/001543

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0229113	A 11-04-2002	AU 9671801 A EP 1355931 A2 US 2002146721 A1	15-04-2002 29-10-2003 10-10-2002